

**PENGARUH PEMBERIAN MADU SUMBAWA TERHADAP AKTIVITAS
PROTEASE DAN KADAR *Malondialdehyde* (MDA) PADA
JEJUNUM TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINDUKSI DIAZINON**

SKRIPSI

Oleh :

**SAYFUDDIN ARIEF HIDAYAT
145130101111054**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN MADU SUMBAWA TERHADAP AKTIVITAS
PROTEASE DAN KADAR *Malondialdehyde* (MDA) PADA
JEJUNUM TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINDUKSI DIAZINON**

SKRIPSI

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan*

Oleh :

SAYFUDDIN ARIEF HIDAYAT
145130101111054



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018

\

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**PENGARUH PEMBERIAN MADU SUMBAWA TERHADAP AKTIVITAS
PROTEASE DAN KADAR *Malondialdehyde* (MDA) PADA
JEJUNUM TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINDUKSI DIAZINON**

Oleh:
SAYFUDDIN ARIEF HIDAYAT
145130101111054

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 195204121980021001

Drh. Herlina Pratiwi, M.Si.
NIP. 198705182010122010

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

**Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Aktivitas Protease Dan
Kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada Jejunum Tikus Putih
(*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Diazinon**

ABSTRAK

Diazinon merupakan salah satu organofosfat yang biasa digunakan sebagai insektisida, yang berperan sebagai xenobiotik. Apabila diazinon masuk kedalam tubuh akan mengalami proses detoksifikasi yang akan menghasilkan senyawa sampingan berupa ROS (*reaktif oksigen spesies*) dan radikal bebas. Madu sumbawa adalah senyawa yang mengandung polifenol dan vitamin C yang berperan sebagai sumber antioksidan yang dapat digunakan untuk menangkap atau menetralkan radikal bebas didalam tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi madu sumbawa sebagai antioksidan pada jejunum tikus yang diinduksi diazinon terhadap aktivitas protease dan kadar MDA tikus jantan (*Rattus norvegicus*) dengan berat 130-180 gram. Dalam penelitian ini hewan percobaan dibagi menjadi 5 kelompok, perlakuan 1 sebagai kelompok kontrol negatif (-), perlakuan 2 sebagai kontrol positif (+), kelompok 3, 4, dan 5 adalah kelompok perlakuan yang diinduksi diazinon dengan dosis 60 mg/kgBB selama 7 hari, kemudian diterapi masing-masing dengan 1mL madu sumbawa dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% selama 14 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian madu sumbawa pada tikus yang diinduksi diazinon dapat menurunkan aktivitas protease sebagai berikut : Kontrol negatif (-) $1,017 \pm 0,015$, kontrol positif (+) $1,522 \pm 0,017$, perlakuan 3 $1,307 \pm 0,051$, perlakuan 4 $1,185 \pm 0,038$, perlakuan 5 $1,095 \pm 0,012$, hasil analisa statistik (ANOVA) menunjukkan bahwa diantara perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$). Hasil pengukuran kandungan MDA, kontrol negatif (-) $142,75 \pm 5,20$, kontrol positif (+) $256,50 \pm 57,26$, perlakuan 3 $207,12 \pm 4,26$, perlakuan 4 $172,75 \pm 7,77$, perlakuan 5 $144,62 \pm 5,54$. Hasil analisa statistik (ANOVA) menunjukkan bahwa diantara perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$). Kesimpulan dari penelitian ini, pemberian madu sumbawa dapat menurunkan aktivitas protease dan kadar MDA pada jejunum tikus yang diinduksi diazinon, pemberian madu dengan konsentrasi 75% memberikan hasil yang terbaik terhadap penurunan aktivitas protease dan kadar MDA.

Kata kunci : *aktivitas protease, diazinon, jejunum, madu sumbawa, MDA.*

The Effect of Sumbawa Honey on Protease Activity and Malondialdehyde (MDA) Levels on the Jejunum of White Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by Diazinon

ABSTRACT

Diazinon is an organophosphate commonly used as an insecticide, which acts as a xenobiotic. Diazinon enters the body it will undergo a detoxification process which will produce side compounds in the form of ROS (reactive oxygen species) and free radicals. Sumbawa Honey is a compound that contains polyphenols and vitamin C which acts as a source of antioxidants that can be used to capture or neutralize free radicals in the body. This study aimed to determine the potential of Sumbawa honey as an antioxidant in the jejunal of diazinon-induced rats on protease activity and MDA levels in male rats (*Rattus norvegicus*) weighing 130-180 grams. In this study, experimental animals were divided into 5 groups, group 1 as the negative control (-), group 2 as the positive control (+), groups 3, 4, and 5 as the treatment groups that were induced by diazinon with dose of 60 mg/kgBW for 7 days, then treated with 1 ml of sumbawa honey with gradual concentrations of 25%, 50%, and 75% for 14 days. The results showed that the giving of sumbawa honey in rats induced by diazinon could reduce protease activity as follows: negative control (-) $1,017 \pm 0,015$, positive control (+) $1,522 \pm 0,017$, treatment 3 $1,307 \pm 0,051$, treatment 4 $1,185 \pm 0,038$, treatment 5 $1,095 \pm 0,012$, the result of statistical analysis (ANOVA) showed that the differences between treatments were significant ($p < 0.01$). The measurement results of MDA levels were showed as follows: negative control (-) 142.75 ± 5.20 , positive controls (+) 256.50 ± 57.26 , treatment 3 207.12 ± 4.26 , treatment 4 172.75 ± 7.77 , treatment 5 144.62 ± 5.54 . The result of statistical analysis (ANOVA) showed that the differences between treatments were significant ($p < 0.01$). The conclusion of this study, the administration of sumbawa honey could reduce protease activity and MDA levels on the jejunum of white rats (*Rattus norvegicus*) that were induced by diazinon, giving of honey with a concentration of 75% gives the best results for a decrease in protease activity and MDA levels

Key word: *diazinon, jejunum, MDA, sumbawa honey, protease activity.*

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan kegiatan menyusun skripsi dengan judul **“Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa Terhadap Aktivitas Protease dan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada Jejunum Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) yang Diinduksi Diazinon”** dengan lancar.

Skripsi ini disusun berdasarkan literatur yang penulis peroleh dari berbagai referensi. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS. Selaku dosen pembimbing I yang telah bersedia membimbing penulis dalam menyusun skripsi ini.
2. drh.Herlina Pratiwi, M.Si. selaku dosen pembimbing II yang telah bersedia membimbing penulis dalam menyusun skripsi ini.
3. drh. Rahadi Swastomo, M.Biomed selaku dosen penguji I yang telah menyisihkan waktu untuk menguji.
4. drh. Mira Fatmawati, M.Si dosen penguji II yang telah menyisihkan waktu untuk menguji.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
6. Keluarga tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dukungan, dan doa untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
7. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu, dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
8. Kepada sahabat lebah madu sumbawa yaitu Firdausi, Ilham, Ila, dan Aisyah yang selalu memberikan semangat dan dukungan kepada penulis selama penyelesaian skripsi ini.
9. Kepada seluruh sahabat-sahabat penulis terima kasih untuk kontribusi, waktu dan semangat yang selalu diberikan.

10. Seluruh kolegium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, khususnya teman-teman kelas 2014 C terimakasih atas dukungan, semangat, inspirasi dan keceriaan yang diberikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap bahwa skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Malang, 1 Februari 2018

Penulis

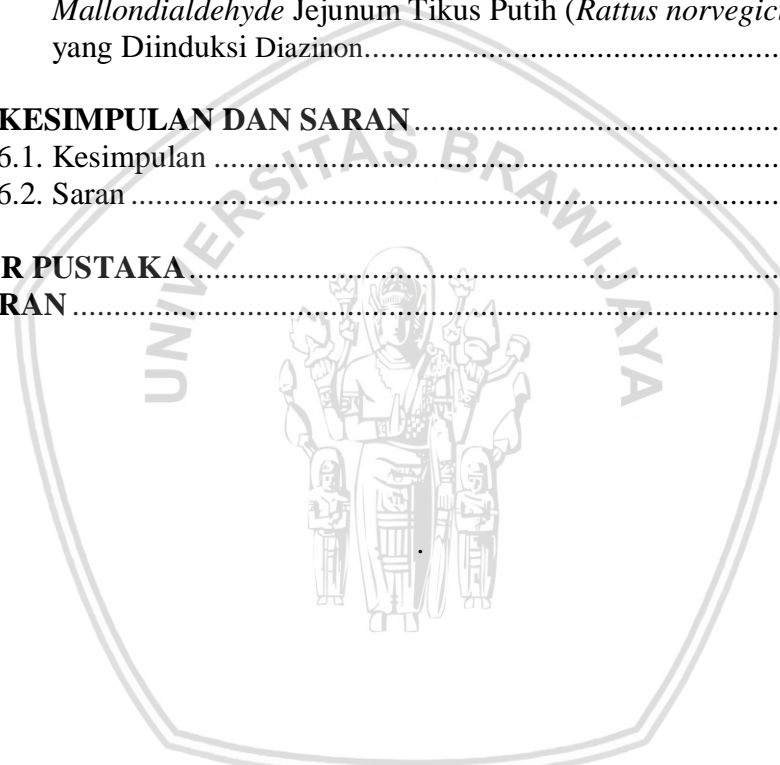


DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xiii
 BAB 1. PENDAHULUAN.....	 1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Batasan Masalah.....	4
1.4. Tujuan	5
1.5. Manfaat	5
 BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	 6
2.1. Diazinon	6
2.2. Mekanisme Toksisitas Diazinon.....	7
2.3. Jejuna	9
2.4. Hubungan <i>Malondialdehyde</i> (MDA) Dengan Residu Diazinon	10
2.5. Hubungan Aktivitas Protease dengan Residu Diazinon	13
2.6. Madu Sumbawa	14
2.7. Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	17
 BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN...19	
3.1. Kerangka Konseptual.....	20
3.2. Hipotesis Penelitian	22
 BAB 4. METODE PENELITIAN.....	 23
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian	23
4.2. Rancangan Penelitian.....	23
4.3. Alat dan Bahan.....	25
4.4. Tahapan Penelitian.....	26
4.5. Variabel Penelitian.....	26
4.6. Prosedur Kerja	26
4.6.1. Persiapan Hewan Coba.....	26
4.6.2. Induksi Diazinon	27

4.6.3. Terapi Madu Sumbawa	27
4.6.4. Pengambilan Sampel Organ Jejunum	28
4.6.5. Isolasi Protease.....	28
4.6.6. Pengukuran Aktivitas Protease	29
4.6.7. Pengukuran Kadar MDA	29
4.6.8. Analisa Data.....	30
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
5.1. Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap aktivitas protease Jejunum Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diinduksi diazinon...	31
5.2. Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Kadar (MDA) ... <i>Mallondialdehyde</i> Jejunum Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi Diazinon.....	38
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	44
6.1. Kesimpulan	44
6.2. Saran	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45
LAMPIRAN	51



DAFTAR TABEL

4.1. Rancangan Penelitian	24
5.1. Aktivitas Protease	31
5.2. Kadar Mallondialdehyde	39



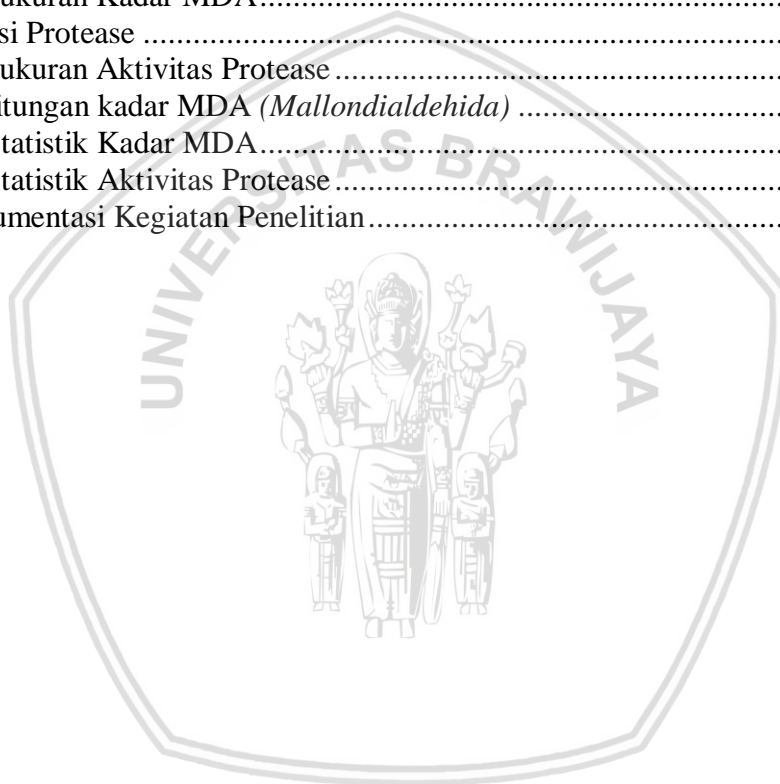
DAFTAR GAMBAR

2.1. Struktur Diazinon.....	6
2.2. Reaksi Metabolisme Organofosfat.....	8
2.3. Anatomi Jejunum.....	10
2.4. Proses Peroksidasi Lipid.....	11
2.5. Struktur Kimia Vitamin C.....	15
2.6. Struktur Kimia Polifenol.....	17
3.1. Kerangka Teori.....	19
3.2. Kerangka Konsep.....	20



DAFTAR LAMPIRAN

1. Keterangan Laik Etik	52
2. Hasil Pengujian TFC Madu Sumbawa	53
3. Hasil Uji Kualitatif Madu Sumbawa.....	54
4. Kerangka Operasional Penelitian.....	55
5. Perhitungan Dosis	56
6. Dosis Madu Sumbawa.....	57
7. Pengambilan Organ Jejunum.....	58
8. Pengukuran Kadar MDA.....	59
9. Isolasi Protease	60
10. Pengukuran Aktivitas Protease	61
11. Perhitungan kadar MDA (<i>Mallondialdehida</i>)	62
12. Uji Statistik Kadar MDA.....	63
13. Uji Statistik Aktivitas Protease	65
14. Dokumentasi Kegiatan Penelitian.....	67



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

%	: Persen
<	: Kurang dari
>	: Lebih dari
=	: Sama dengan
°	: Derajat
α	: Alfa
μ l	: Mikroliter
ATP	: <i>Adenin Tri Phosphate</i>
BNJ	: Beda nyata jujur
BB	: Berat badan
cm	: Senti meter
g	: gram
H ⁺	: Hidrogen
HCl	: hidrogen klorida
H ₂ O	: Air
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
Na-Thio	: <i>Natrium Thiosulfat</i>
NPN	: <i>Non-protein nitrogen compound</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PUFA	: <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
RAL	: Rancangan acak lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diazinon merupakan salah satu organofosfat yang biasa digunakan oleh petani untuk membasmi hama. Diazinon merupakan insektisida organofosfat yang bersifat toksik (Djumadi, 2008). Insektisida digunakan untuk peningkatan produksi tanaman, namun penggunaan yang tidak sesuai atau berlebih dapat menyebabkan residu pada tanaman yang berbahaya bagi kesehatan (Wulandari, 2006). Menurut Yuningsih (2010), organofosfat telah dilaporkan menyebabkan kematian akut pada beberapa jenis ternak. Diazinon masih banyak digunakan oleh masyarakat dan terdeteksi adanya residu pada pakan ternak. Menurut Yuningsih, dan Sri Yuliasuti (1998), telah dilaporkan bahwa organofosfat diazinon telah menyebabkan kematian pada ayam di Sukabumi, Bogor, dan Garut pada tahun 1998.

Menurut Yuningsih (2010), efek terhadap hewan dapat berupa keracunan akut akibat terhambatnya enzim asetilkolinesterase yang berfungsi memecah neurotransmitter asetilkolin (ACh). Asetilkolin yang tidak terhidrolisi dapat menyebabkan hantaran impuls yang tertunda sehingga produksi salivasi berlebih, diare, kejang, kelumpuhan, dan berakhir kematian (Wulandari, 2006).

Menurut (Xu and Cranwell, 2003). Pada lapisan mukosa usus halus terdapat suatu bentuk khusus berupa vili-vili. Vili memperluas permukaan area lumen serta membantu proses absorpsi. Selain itu pada mukosa usus juga ditemukan kript-kript usus. Kelenjar yang terdapat pada mukosa memiliki bentuk tubular sederhana. Pada daerah dibawah epithelium merupakan lamina propia. Lapisan submukosa usus halus terdiri dari jaringan ikat, pembuluh darah dan pembuluh limfatik. Pada bagian mukosa terdapat tiga macam jenis sel, yaitu sel absorbtif, sel goblet, dan sel M (*microfold*). Menurut (Mohamed, 2009). Pada penelitian yang dilakukan kerusakan jejunum yang terjadi akibat paparan diazinon

antara lain yaitu, terjadinya peningkatan peroksidasi lipid jejunum, penurunan aktivitas penyerapan nutrisi pada jejunum, terjadinya kerusakan vili, adanya infiltrasi dan hipertrofi pada sel jejunum, terdapat hemoragi, terjadinya pendarahan pada submukosa jejunum, dan erosi pada lapisan epitel jejunum. Peroksidasi lipid merupakan bentuk dari *polyunsaturated* yang bersifat tidak stabil, sehingga dapat dengan mudah diurai menjadi kompleks senyawa salah satunya *Malondialdehyde* (MDA). Stress oksidatif merupakan keadaan ketidakseimbangan antara ROS dan antioksidan baik enzimatis ataupun non enzimatis. Stres oksidatif yang menyebabkan nefrotoksik ini mempengaruhi aktivitas protease pada suatu organ (Wati, 2013). Protease juga dapat menjadi indikator peningkatan peroksidasi lipid karena kerusakan sel yang terjadi pada keadaan inflamasi juga diakibatkan oleh pelepasan enzim protease oleh neutrofil yang berfungsi melisiskan sel yang nekrosis (Stephenson, 1992).

Madu sumbawa dikenal banyak mengandung zat-zat yang bermanfaat bagi tubuh. Kandungan madu diantaranya adalah air, glukosa, fruktosa, vitamin, mineral, protein, flavonoid dan alkaloid. Kementerian Kehutanan telah menetapkan Sumbawa sebagai klaster madu nasional sehingga nilai madu sumbawa di level nasional. Madu Sumbawa didapat dari hutan-hutan Sumbawa. Sumbawa terletak pada geografis yang membuat madu Sumbawa berbeda dengan lainnya (Zulhawa, 2010). Menurut Legowo (2015), madu memiliki efek antioksidan karena mengandung vitamin C, flavonoid, polifenol, mangan, betakaroten dan masih banyak zat aktif lain yang mampu melindungi sel dalam tubuh dengan cara menetralkan radikal bebas.

Berdasar latar belakang tersebut, penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui efektivitas pemberian madu sumbawa terhadap tikus yang diinduksi diazinon. Hasil yang didapat diharap adanya penurunan kadar protease dan *malondialdehyde* (MDA) pada organ

jejunum yang telah diinduksi diazinon dan diterapi dengan madu sumbawa. Sehingga, diharapkan madu sumbawa dapat sebagai obat alternatif dari toksikasi diazinon.

1.1 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Apakah madu Sumbawa dapat menurunkan aktivitas protease jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon?
2. Apakah madu Sumbawa dapat menurunkan kadar MDA jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon?

1.2 BATASAN MASALAH

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan umur 1,5 tahun dan berat badan 130-180 gram. Tikus didapat dari Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Bawijaya Malang.
2. Penelitian yang dilakukan sudah mendapatkan surat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (975-KEP-UB) (**Lampiran 1**).
3. Diazinon yang diberikan yaitu dosis 60 mg/kgBB per hari selama tujuh hari pemberian (Ulansari, 2017).
4. Madu Sumbawa yang digunakan diambil dari hutan Sumbawa, kemudian dideterminasikan di Balai Materia Medica Batu Malang (**Lampiran 2**).
5. Madu Sumbawa yang diberikan yaitu konsentrasi 25% dalam 1 mL secara per oral berdasarkan kelompok perlakuan 3, 50% dalam 1 mL pada kelompok perlakuan 4 dan 75% dalam 1 mL pada kelompok perlakuan 5 pada hari ke-8 selama 14 hari.

6. Parameter yang diamati adalah aktivitas Protease dengan cara perhitungan walter dan kadar *Malondialdehyde* (MDA) dengan cara uji TBA pada organ jejunum.

1.3 TUJUAN

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh madu sumbawa dalam menurunkan aktivitas protease jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.
2. Mengetahui pengaruh madu sumbawa dalam menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.
3. Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi kepada masyarakat tentang pengaruh pemberian madu sumbawa sebagai tindakan pengobatan pada keracunan yang disebabkan oleh residu organophosphat diazinon.

1.4 MANFAAT

Manfaat dari penelitian ini adalah:

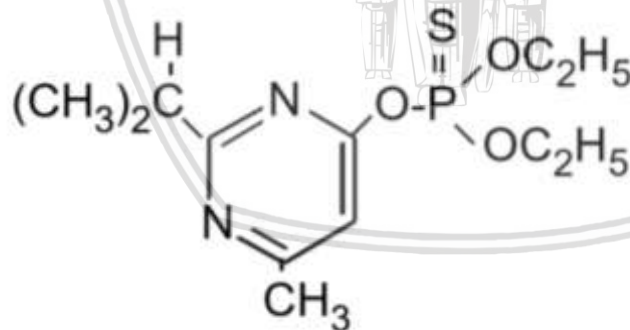
1. Mengetahui pengaruh madu sumbawa terhadap aktivitas protease jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.
2. Mengetahui pengaruh madu sumbawa terhadap kadar *Malondialdehyde* (MDA) jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diazinon

Diazinon merupakan insektisida organofosfat yang banyak digunakan dalam bidang pertanian untuk membasmi hama pengganggu (Himawan, 2012). Diazinon merupakan salah satu organofosfat insektisida yang bersifat toksik dan apabila digunakan dalam jumlah berlebih dapat menyebabkan residu. Diazinon dapat masuk ke dalam tubuh melalui kulit, paru-paru, dan saluran cerna (Djumadi, 2008).

Diazinon dalam bidang pertanian digunakan untuk membasmi serangga juga dapat digunakan dalam bidang peternakan untuk membasmi serangga di dalam tanah dan ektoparasit. Mekanisme kerja diazinon yaitu dengan cara menghambat enzim kolinesterase secara irreversibel. Enzim kolinesterase ini berfungsi untuk memecah asetilkolin yang merangsang saraf otot (Usman, 2013).



Gambar 2.1. Struktur Diazinon (Cox, 2000)

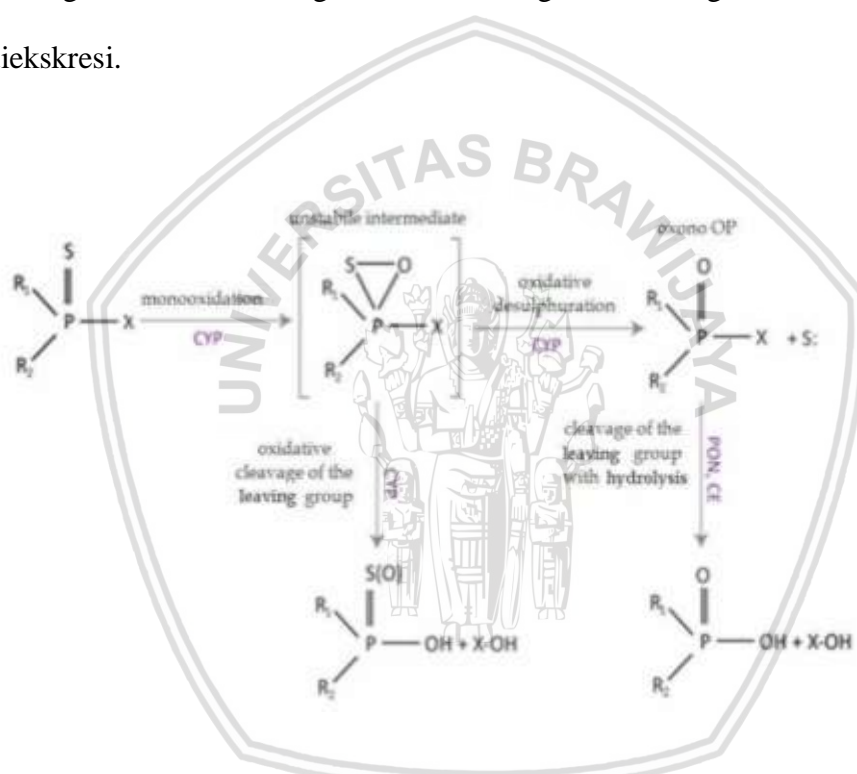
Diazinon memiliki nama kimia yaitu O,O-diethyl O-(2- isopropyl-6-methyl-4pyrimidinyl) phosphorothioate dan merupakan insektisida yang memiliki toksisitas sedang secara akut dengan rentang yang luas. LD50 untuk manusia yaitu 350-400 mg/kgBB, untuk burung antara 2-40 mg/kgBB, sedangkan nilai LD50 untuk tikus bervariasi antara 66-635 mg/kgBB untuk tikus betina dan 96-967 mg/kgBB untuk tikus jantan. Seperti pestisida golongan organofosfat yang lain, diazinon bekerja di dalam tubuh hewan dengan mengikat molekul cholinesterase dalam darah dan jaringan (Debski, 2007).

2.2 Mekanisme Toksisitas Diazinon

Diazinon termasuk dalam senyawa xenobiotik karena berupa agen yang tidak diperlukan oleh tubuh (Wulandari, 2006). Metabolisme organofosfat sebagai xenobiotik terdiri dari 2 fase, yaitu fase oksidasi dimana enzim metabolik mengaktivasi komponen kimia dengan mengenai gugus fungsi organofosfat dan fase konjugasi merupakan proses perubahan struktur organofosfat menjadi molekul hidrofilik seperti asam glukoronat, sulfat, glisin, dan asam glutamat dengan bantuan enzim agar mudah diekskresi (Wulandari, 2006).

Menurut Aulia (2017), menyatakan bahwa metabolisme organofosfat fase I terdiri dari reaksi oksidasi yang merupakan suatu reaksi aktivasi thiono-organofosfat menjadi oxono-organofosfat dan atom sulfur dengan bantuan enzim *Cytochrome P450* (CYP) sehingga Oxono-organofosfat menjadi molekul aktif yang mampu menghambat fungsi dari AChE. Reaksi hidrolisis termasuk dalam metabolisme fase I, dimana hidrolisis terjadi setelah reaksi oksidasi berlangsung dengan bantuan enzim *paraoxonase* (PON)

reaksi ini penting untuk proses detoksifikasi. Detoksifikasi organofosfat terjadi ketika paraoxonase memecah organofosfat menjadi dialkylfosfat dan leaving group. Organofosfat juga dihidrolisis oleh carboxylesterase (CE) yang mampu melakukan inaktivasi diri pada proses hidrolisis (Elersek and Metka, 2011). Fase II metabolisme diazinon merupakan proses perubahan struktur diazinon menjadi molekul hidrofilik seperti asam glukoronat, sulfat, glisin, dan asam glutamat dengan bantuan enzim agar mudah diekskresi.



Gambar 2.2 Reaksi Metabolisme Organofosfat (Hreljac, 2009)

Senyawa metabolit diazinon yang terbentuk, akan meningkatkan radikal bebas dalam tubuh karena aktivasi senyawa ini memiliki sifat yang lebih poten dan efek yang ditimbulkan lebih toksik dalam menyebabkan kerusakan sel dibandingkan dengan senyawa pembentuk. Senyawa ini akan menyebar ke seluruh tubuh, sehingga mengakibatkan gangguan aliran ion melalui membran sel. Ketidakseimbangan ion dalam

sel akan meningkatkan ROS dan menginduksi stress oksidatif yang akan berdampak pada kerusakan sel (Elsrek and Metka, 2011).

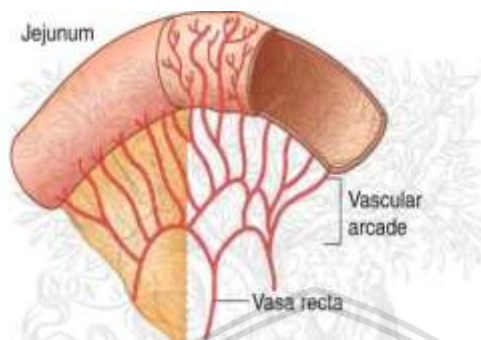
2.3 Anatomi Jejunum

Usus Halus merupakan bagian pencernaan yang terletak diantara lambung dan usus besar. Dinding dari usus halus kaya akan pembuluh darah yang berfungsi sebagai pengangkut zat-zat nutrisi menuju hati melalui vena porta. Dinding dari usus halus akan mengeluarkan lendir dan air yang membantu melarutkan pecahan-pecahan makanan yang dicerna. Dinding usus halus juga melepaskan sejumlah kecil enzim yang membantu proses pencernaan.

Usus halus dibagi menjadi tiga bagian yaitu duodenum, jejunum, ileum. Pada jejunum memiliki banyak vili dan lipatan mukosa yang melingkar. Dinding usus halus terdiri dari empat lapis bagian yaitu mukosa, sub-mukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa. Mukosa ini diselimuti oleh vili yang berkembang dengan baik sehingga menyebabkan gambaran mukosa yang menyerupai beludru. Vili pada jejunum memiliki bentuk seperti lidah pada bagian jejunum proksimal, dan berbentuk seperti jari panjang pada bagian jejunum distal (Swenson, 2000).

Menurut (Xu and Cranwell, 2003), pada lapisan mukosa usus halus terdapat suatu bentuk khusus berupa vili-vili. Vili memperluas permukaan area lumen serta membantu proses absorpsi. Selain itu pada mukosa usus juga ditemukan kript-kript usus. Kelenjar yang terdapat pada mukosa memiliki bentuk tubular sederhana. Pada daerah dibawah epithelium merupakan lamina propia. Lapisan submukosa usus halus terdiri dari jaringan

ikat, pembuluh darah dan pembuluh limfatik. Pada bagian mukosa terdapat tiga macam jenis sel, yaitu sel absorbtif, sel goblet, dan sel M (*microfold*).



Gambar 2.3. Anatomi jejunum

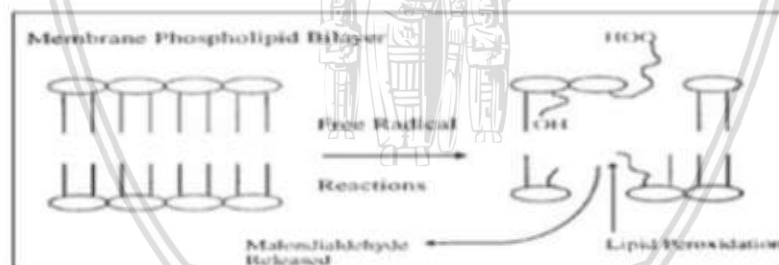
Menurut (Mohamed, 2009). Pada penelitian yang dilakukan kerusakan jejunum yang terjadi akibat paparan diazinon antara lain yaitu, terjadinya peningkatan peroksidasi lipid jejunum, penurunan aktivitas penyerapan nutrisi pada jejunum, terjadinya kerusakan vili, adanya infiltrasi dan hipertrofi pada sel jejunum, terdapat hemoragi, terjadinya pendarahan pada submukosa jejunum, dan erosi pada lapisan epitel jejunum.

2.4 Hubungan Malondialdehyde (MDA) Dengan Residu Diazinon

Peningkatan ROS akibat induksi diazinon menyebabkan terjadinya peningkatan peroksidasi lipid jejunum, terjadinya kerusakan vili, terjadinya pendarahan pada submukosa jejunum, dan erosi pada lapisan epitel jejunum. Diazinon sebagai sumber radikal bebas yang dapat menyebabkan stres oksidatif dan menginduksi terjadinya peroksidasi lipid (Oksay, 2012). Peroksidasi lipid merupakan reaksi antara radikal bebas maupun oksidan yang menyerang lipid yang mengandung ikatan karbon ganda terutama pada PUFA. Peroksidasi lipid melibatkan pemisahan hidrogen dari rantai karbon yang digantikan oleh oksigen untuk menjadi *lipid peroxy radicals* dan lipid hidroperoksida (Ayala *et al.*, 2014). PUFA didegradasi oleh radikal-radikal bebas sehingga menghasilkan

produk samping yang disebut malondialdehid (MDA). Malondialdehid dapat digunakan untuk mengetahui drajat kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh peroksidasi lipid (Retno *et al.*, 2012)

Peroksidasi lipid merupakan suatu marker kerusakan (*oxidative injury*) yang dipresentasikan sebagai MDA (*malondialdehyde*). MDA merupakan senyawa toksik yang dapat mengganggu keutuhan membran sel, karena itu bila kadarnya tinggi, maka akan mengganggu berfungsinya sel (Winarsi, 2007). MDA (*malondialdehyde*) dapat terbentuk apabila radikal bebas hidroksil seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) bereaksi dengan komponen asam lipid dari membran sel sehingga terjadi reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. (**Gambar 2.4**). Peroksidasi lipid tersebut akan menyebabkan terputusnya rantai asam lipid menjadi berbagai senyawa toksik dan menyebabkan kerusakan pada membran sel (Yunus, 2001).



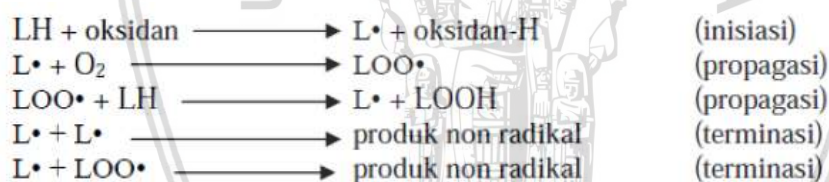
Gambar 2.4 Proses peroksidasi lipid (Yunus, 2001)

Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS), membentuk hidroperoksida. Beberapa spesies oksigen reaktif yang dijumpai dalam tubuh adalah:

- *Superoxide radical* (O_2^-)

- *Hydroxyl radical* (OH⁻)
- *Nitric oxide radical* (NO⁻)
- *Peroxyl radical* (ROO⁻)
- *Lipid peroxyl radical* (LOOH)
- *Hydrogen peroxide* (H₂O₂)
- *Singlet oxygen* (IO₂)
- *Hypochlorous acid* (HOCl) (Winarsi, 2007).

Dari hasil metabolisme didalam tubuh, diazinon akan menghasilkan living grup yang memiliki gugus (OH⁻) dan bersifat radikal bebas, oleh karena itu radikal bebas (OH⁻) inilah yang nantinya berperan dalam proses peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid terjadi melalui beberapa tahapan reaksi yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi :



Lipid (LH) penyusun membran sel biasanya berupa asam lemak tak jenuh ganda. Peroksidasi dimulai (inisiasi) dari hasil atom hidrogen pada gugus metilen oleh ROS (OH⁻) membentuk radikal karbon (L[•]). Apabila radikal karbon bereaksi dengan oksigen maka akan terbentuk radikal peroksil (LOO[•]). Reaksi berikutnya adalah hasil atom hidrogen lipid lain oleh radikal peroksil membentuk lipid hidroperoksida yang bersifat sitotoksik (LOOH), sehingga terjadi reaksi berantai. Reaksi akan berakhir (terminasi) jika radikal karbon yang terbentuk pada tahap inisiasi ataupun radikal lain yang terbentuk

pada reaksi propagasi bereaksi dengan radikal lain menjadi produk non radikal (Setiawan dan Suhartono, 2007).

Diazinon merupakan salah satu organofosfat yang akan mengalami proses metabolisme di dalam tubuh. Diazinon akan dioksidasi membentuk oxono-organophosphate oleh enzim *Cytochrome P450* (CYP) dan dilanjutkan proses hidrolisis. Proses hidrolisis diazinon dibantu oleh *paraoxonase-1* (PON1) akan menghasilkan leaving group dan dialkylphosphate, dimana senyawa tersebut memiliki gugus (OH-) (Poet *et. al.*, 2004). OH- merupakan Reactive Oxygen Species (ROS) yang dapat ditemui dalam tubuh selain Superoxide radical (O₂-), nitric oxide radical (NO-), Peroxyl radical (ROO-), Lipid peroxyl radical (LOOH), Hydrogen peroxyde (H₂O₂), singlet oxygen (IO₂), Hypochlorous acid (HOCl) (Winarsi, 2007).

2.5 Hubungan Aktivitas Protease dengan Residu Diazinon.

Pemberian diazinon pada tikus akan menyebabkan semua perubahan yang mengarah pada *diazinon-mediated* renal stres oksidatif dan toksisitas (Shah, 2010). Stres oksidatif merupakan keadaan ketidakseimbangan antara ROS dan antioksidan baik enzimatis ataupun non enzimatis (Wati, 2013). ROS yang berlebih akan memicu stres oksidatif yang dapat mengaktifkan sel-sel sitokin proinflamator seperti TNF- α , IL-4, dan IL-13. TNF- α akan menyebabkan inflamasi dan meningkatkan aktivasi neutrofil sedangkan IL-4 dan IL-13 akan mengaktifkan sel B yang memproduksi Ig E sehingga dapat mengaktifasi sel mast. Sel mast dan neutrofil yang teraktivasi akan menghasilkan protease sebagai respon adanya inflamasi, oleh sebab itu protease dapat digunakan sebagai indikator tingkat keparahan inflamasi (Campbell *et al.*, 2006).

2.6 Madu Sumbawa

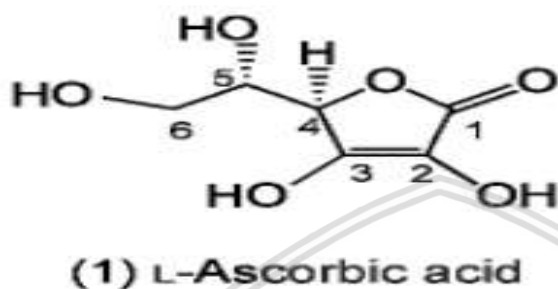
Madu merupakan cairan kental yang dihasilkan oleh lebah. Madu diperoleh dari nektar bunga ataupun dari bagian tanaman hidup lainnya yang kemudian diolah dengan cara diikat dengan senyawa-senyawa tertentu dan disimpan disarang lebah (Azrizal, 2017).

Komponen utama madu adalah glukosa dan fruktosa, sedangkan komposisi kimia dalam 100mg madu antara lain: karbohidrat 82,5 gr; serat pangan 02 gr; lemak 0 gr; protein 0,3 gr; riboflavin 0,038 mg; niacin 0,121 mg; *Panthotenic Acid* (B5) 0,068 mg; vitamin B6 0,024 mg; Folate (vitamin B9) 2,25 mg; vitamin C 0,5 mg; Kalsium 6 mg; besi 0,42 mg; magnesium 2 mg; fosforus 4 mg; potasium 52 mg; sodium 4 mg; dan zinc 0,22 mg. Komponen madu dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, asal geografis, sumber nektar, kondisi lingkungan, iklim, dan teknik pengolahan (Azrizal, 2011).

Madu Sumbawa dikenal sebagai madu terbaik di Indonesia karena madu diperoleh dari hutan Sumbawa. Madu Sumbawa dihasilkan oleh lebah-lebah hidup di hutan Sumbawa, sehingga memperoleh makanan secara alami dari hutan. Sumbawa terkenal dengan hutan bidara atau *Ziziphus mauritiana*. Sumbawa juga memiliki letak geografis yang kering dan rendah, sehingga kadar air dalam madu Sumbawa sebesar 19,88% sedangkan kadar air pada madu hutan lainnya berada pada kisaran 22%-26% (Zulhawa, 2010). Bidara merupakan tumbuhan yang dilaporkan memiliki kandungan flavonoid tinggi sehingga memiliki aktivitas antikanker, antiinflamasi, antifungi, dan antioksidan

(Haeria, 2016). Selain flavonoid terdapat banyak kandungan madu yang penting misalnya :

a. Vitamin C



Gambar 2.5 Struktur Kimia Vitamin C (Kirk, 1996)

Antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai peroksidasi lipid dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Antioksidan yang dikenal ada 2, yaitu berupa enzim atau golongan antioksidan endogen dan ada yang berupa mikronutrien. Enzim antioksidan dibentuk dalam tubuh, yaitu super oksida dismutase (SOD), glutathion peroksida, katalase, dan glutathion reduktase. Sedangkan antioksidan yang berupa mikronutrien dikenal tiga yang utama, yaitu : b-karoten, vitamin C dan vitamin E (Iswari, 2009).

Selain itu vitamin C juga dapat menyumbangkan elektron ke dalam reaksi biokimia intraseluler dan ekstraseluler. Vitamin C adalah 6 atom karbon lakton yang disintesis dari glukosa yang terdapat dalam hepar. Bentuk utama dari vitamin C yang

dinamakan adalah *L-ascorbic* dan *dehydroascorbic acid*. Vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif di dalam sel hepatosit bahkan netrofil, monosit, protein serta dapat bereaksi dengan besi-ferritin. Diluar sel, Vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif, mencegah *Low Density Lipoprotein* (LDL) teroksidasi, mentransfer elektron ke dalam tokoferol teroksidasi dan mengabsorpsi logam dalam saluran cerna (Adi *et al.*, 2009).

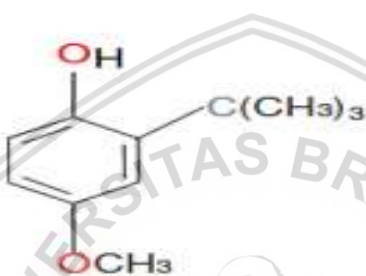
Sebagai antioksidan, vitamin C dapat langsung bereaksi dengan anion superoksida, radikal hidroksil, oksigen singlet dan lipid peroksida. Sebagai reduktor menurut Berger (2009) vitamin C akan mendonorkan satu elektron membentuk semidehidroaskorbat yang tidak bersifat reaktif dan selanjutnya mengalami reaksi disproporsionasi membentuk dehidroaskorbat yang bersifat tidak stabil. Dehidroaskorbat akan terdegradasi membentuk asam oksalat dan asam treonat.

b. Polifenol

Senyawa fenol merupakan suatu senyawa yang mengandung gugus hidroksil (-OH) yang terikat langsung pada gugus cincin hidrokarbon aromatik. Klasifikasi senyawa fenol yang terkandung dalam madu yaitu fenol sederhana, benzoquinone, asam fenolat, asetofenon, naftokuinon, xanton, bioflavonoid kumarin, stilben, turunan tirosin, asam hidroksi sinamat, flavonoid, lignan, dan tanin (Dhianawaty, 2013).

Senyawa fenol alami yang bersifat antioksidan dapat diklasifikasikan dalam 2 kelompok, yaitu kelompok lipofilik dan hidrofilik (di antaranya senyawa fenol). Aktivitas antioksidan dari senyawa fenol terbentuk karena kemampuan senyawa fenol membentuk ion fenoksida yang dapat memberikan satu elektronnya kepada radikal bebas

(Saxena, 2013). Gambaran pada umumnya yaitu, antioksidan senyawa fenol (PhH) dapat bereaksi dengan radikal bebas ($\text{ROO}\bullet$) membentuk ROOH dan sebuah senyawa fenol radikal ($\text{Ph}\bullet$) yang relatif tidak reaktif. Selanjutnya, senyawa fenol radikal ($\text{Ph}\bullet$) dapat bereaksi kembali dengan radikal bebas ($\text{ROO}\bullet$) membentuk senyawa yang bersifat tidak radikal (Dhianawaty, 2013).



Gambar 2.6 Kimia Struktur Polifenol (Hamid, 2010)

2.7 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Menurut Maula (2014), klarifikasi dari tikus putih yaitu sebagai berikut:

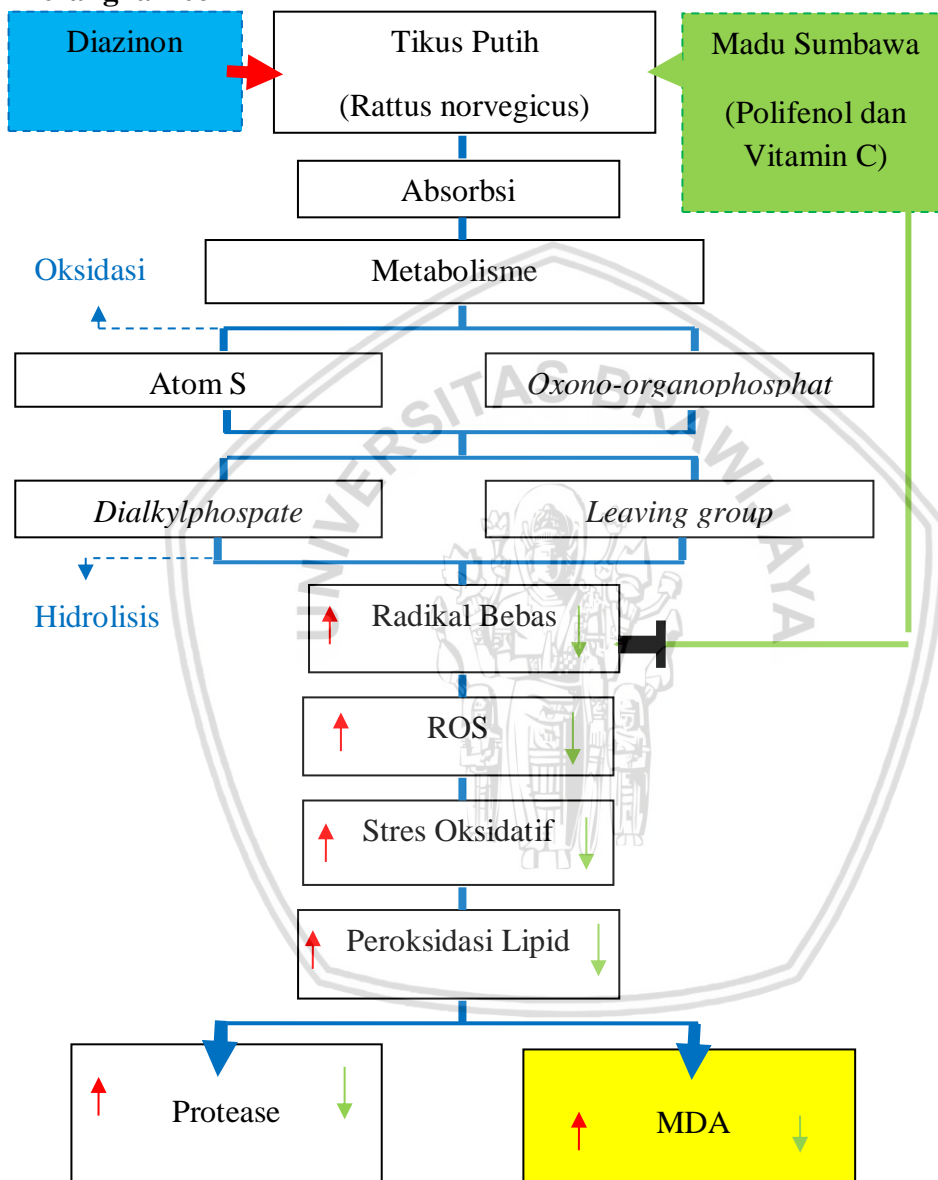
Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: Rattus
Species	: <i>norvegicus</i>

Tikus termasuk hewan mamalia, sehingga untuk hewan coba hasil yang didapat pada tikus tidak akan jauh berbeda dengan mamalia lain. Tikus memiliki lama hidup 2-3 tahun. Berat tikus dewasa 300-400 g untuk jantan dan 250-300 g untuk tikus betina dewasa. Tikus putih memiliki kelebihan dibanding tikus liar yaitu mudah dalam perawatannya, cepat dewasa dan lebih cepat untuk berkembang biak (Maula, 2014).

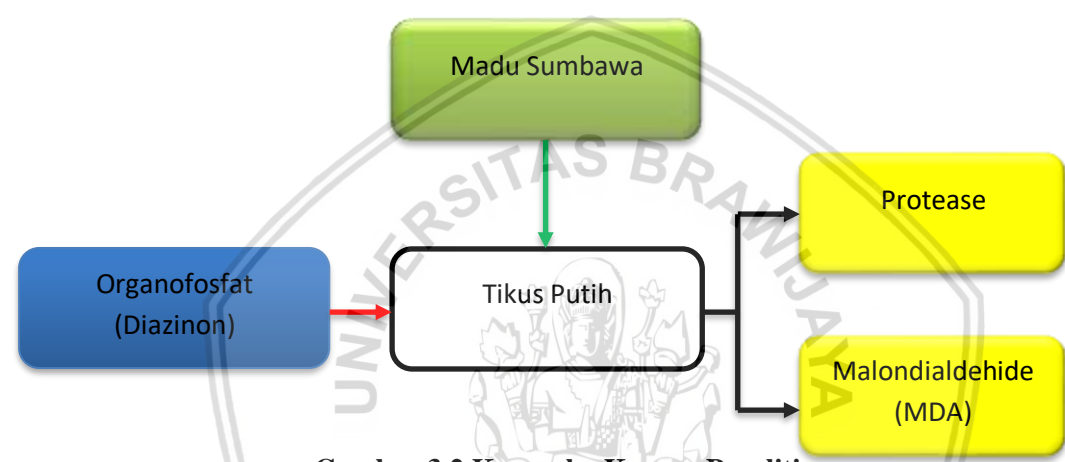
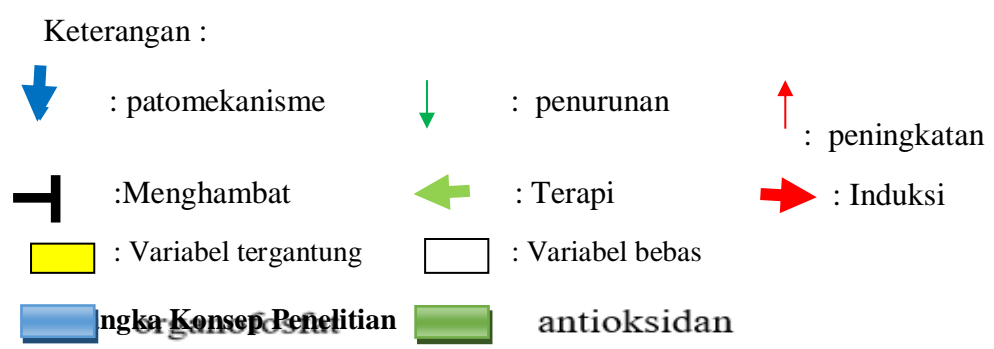


BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

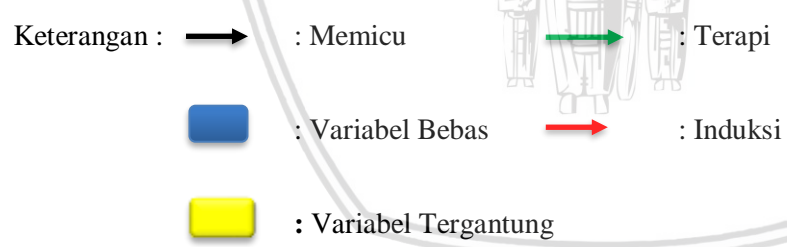
3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori Penelitian



Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian



Senyawa organofosfat diazinon masuk kedalam tubuh melalui mulut menuju saluran pencernaan, kemudian senyawa tersebut akan langsung mengiritasi epitel jejunum, selanjutnya diabsorbsi dan dimetabolisme dalam hepar menjadi bentuk yang aktif. Metabolisme organofosfat terjadi dalam dua fase yaitu fase I dan fase II. Metabolisme fase I senyawa organofosfat melibatkan proses oksidasi dan hidrolisis. Reaksi oksidasi merupakan reaksi yang penting dalam aktivasi thiono-organofosfat

menjadi bentuk yang lebih aktif, dengan bantuan enzim *Cytochrome P450* (CYP), thiono-organofosfat dioksidasi menjadi oxono-organofosfat dengan pengikatan atom oksigen pada atom sulfur, sehingga terjadi intermediat yang tidak stabil. Oxono-organofosfat hasil oksidasi memiliki toksisitas yang tinggi, sehingga akan meningkatkan radikal bebas dalam tubuh. Sedangkan, pengaruh aktif dari atom S sebagai produk sampingan reaksi ini masih belum diketahui. Oxono-organofosfat yang terbentuk dari reaksi oksidasi kemudian akan dihidrolisis dengan bantuan enzim esterase A yang juga disebut sebagai reaksi *Paraoxonase* (PON), kemudian terpecah menjadi *dealkylphosphate* dan *leaving group*. *Dealkylphosphate* selanjutnya akan dikatalis oleh enzim pada fase II yang akan menghasilkan molekul yang lebih bersifat hidrofilik, sehingga lebih mudah diekskresikan lewat urin, sedangkan *leaving group* yang terbentuk dapat meningkatkan ROS. *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang meningkat akan menyebabkan ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas yang ada didalam tubuh.

Peningkatan radikal bebas yang tidak diimbangi dengan peningkatan antioksidan akan menginduksi terjadi stress oksidatif, sehingga berdampak pada kerusakan sel termasuk sel-sel pada jejunum. Stress oksidatif akan menginduksi peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan suatu reaksi dimana radikal bebas maupun oksidan menyerang lipid yang mengandung ikatan karbon ganda terutama pada *polyunsaturated fatty acid*. Peroksidasi lipid melibatkan pemisahan hidrogen dengan rantai karbon dan digantikan oleh oksigen untuk menjadikan lipid *peroxyl radicals* dan lipid hidroperoksida. Radikal hidroksil memiliki sifat yang sangat reaktif karena dapat menginduksi reaksi peroksidasi lipid. Salah satu hasil akhir dari peroksidasi lipid adalah

MDA. Sehingga dapat dikatakan bahwa peningkatan stress oksidatif akan sebanding dengan peningkatan MDA.

ROS yang berlebih akan memicu stres oksidatif yang dapat mengaktifkan sel-sel sitokin proinflamator seperti $\text{TNF-}\alpha$, IL-4, dan IL-13. $\text{TNF-}\alpha$ akan menyebabkan inflamasi dan meningkatkan aktivasi neutrofil sedangkan IL-4 dan IL-13 akan mengaktifkan sel B yang memproduksi Ig E sehingga dapat mengaktifkan sel mast. Sel mast dan neutrofil yang teraktivasi akan menghasilkan protease sebagai respon adanya inflamasi, oleh sebab itu protease dapat digunakan sebagai indikator tingkat keparahan inflamasi.

Madu Sumbawa mengandung antioksidan, karena mengandung polifenol dan vitamin C. Antioksidan dalam madu Sumbawa dapat membantu antioksidan dalam tubuh yang akan menurunkan ROS sehingga dapat menurunkan kadar MDA dan Protease pada jejunum tikus. Madu mengandung komponen antioksidan diantaranya vitamin C, polifenol, mangan, flavonoid, dan beberapa antioksidan lain. Antioksidan dalam madu bekerja dalam menangkal radikal bebas dengan cara mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas yang menyebabkan senyawa tersebut menjadi stabil dan kurang reaktif. Keseimbangan antara oksidan dengan antioksidan akan menurunkan ROS, sejalan dengan itu terjadi penurunan stres oksidatif dan peroksidasi lipid. Penurunan stres oksidatif akan sebanding dengan penurunan kadar MDA dalam jaringan. Penurunan tersebut juga berpengaruh pada penurunan aktivitas protease.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut : Pemberian madu Sumbawa pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah diinduksi diazinon dapat menurunkan aktivitas protease dan kadar malondialdehyde (MDA).



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2018 yang bertempat di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang. Pembacaan kadar MDA (*Malondyaldehyde*) di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Pembacaan aktivitas protease di Laboratorium Kimia Universitas Brawijaya.

4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan tikus putih sebagai hewan coba dengan berat badan 130-180 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari, ditempatkan di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang. Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok dan besar sampel ditentukan dengan rumus *Federer* (Kusriningrum, 2008) :

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan

berdasarkan perhitungan tersebut, maka perlakuan dibagi menjadi 5 macam kelompok, jumlah ulangan 4 kali dalam setiap kelompok sehingga total tikus yang diperlukan adalah 20 ekor. Perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu, perlakuan 1, perlakuan 2, perlakuan 3, perlakuan 4, dan perlakuan 5. Kelompok perlakuan 1

merupakan kelompok kontrol sehat yang diberi minum *ed libitum* dan pakan basal. Kelompok perlakuan 2 merupakan kelompok kontrol yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/KgBB diberikan secara per oral. Kelompok perlakuan 3 merupakan kelompok yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/KgBB dan diterapi dengan madu sumbawa sebanyak 1 mL/ekor perhari dengan konsentrasi 25% yang keduanya diberikan secara per oral. Kelompok perlakuan 4 merupakan kelompok yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/kgbb dan diterapi dengan madu sumbawa sebanyak 1 mL/ekor perhari dengan konsentrasi 50% yang keduanya diberikan secara per oral. Kelompok perlakuan 5 merupakan kelompok yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/KgBB dan diterapi dengan madu sumbawa sebanyak 1 mL/ekor perhari dengan konsentrasi 75% yang keduanya diberikan secara per oral. Berikut diperinci pada **Tabel 4.1** Rancangan penelitian.

Perlakuan	Ulangan			
	1	2	3	4
Perlakuan 1 sebagai Kontrol negatif Tanpa diberi induksi diazinon dan tanpa terapi madu				
Perlakuan 2 sebagai Kontrol positif Diberikan diazinon 60mg/kgBB				
Perlakuan 3 Diberikan diazinon per-oral 60mg/kgBB dan diterapi dengan madu sebanyak 1mL/ekor perhari dengan konsentrasi 25%				
Perlakuan 4 Diberikan diazinon per-oral 60mg/kgBB dan diterapi dengan madu sebanyak 1mL/ekor perhari dengan konsentrasi 50%				
Perlakuan 5 Diberikan diazinon per-oral 60mg/kgBB dan diterapi dengan				

madu sebanyak 1mL/ekor perhari 1 dengan konsentrasi 75%				
---	--	--	--	--

4.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam pemeliharaan hewan coba berupa kandang tikus, botol minum, tempat makan tikus, lampu, sonde, spuit, mortir. Pengujian *Malondialdehyde* (MDA) berupa pipet, stir bar, tabung, mikrosentrifugasi poliprolena, gunting, kertas saring, pinset, blender, mikroskop cahaya, semi-mikrokuvet, spektrofotometer, vortex, *magnetic stirrer*, *water bath*.

Pengujian aktivitas protease berupa seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas, mortar, mikro pipet, penangas air, waterbath, appendof, lemari pendingin, pH meter digital (Inolab-WTW), seperangkat alat sentrifugasi (tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi Denley tipe BR401), inkubator (memmert), vortex (Guo-Huq), Sonikator (Branson 200), spektrofotometri UV, mikroskop cahaya (nikon BX-53), autoclaf, spuit, *hot plate*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan berat 130-180 gram, organofosfat (diazinon), *aquades*, makanan pellet. Bahan yang digunakan untuk pengujian kadar *Malondialdehyde* (MDA) yaitu organ jejunum, 2-*thiobarbiturat acid*, asam asetat glacial, natrium hidroksida, malondialdehida bis, PBS. Bahan yang digunakan untuk pengujian aktivitas protease yaitu *Cyclosporine-A*, Tri Chloro acetic Acid, tirosin, kasein, HCl, KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄.H₂O, *Tween*, NaN₃ 1% . *Poly Methyl Sulfonyl Fluoride*, etanol absolut, Tris-HCl, KMnO₄.

4.4 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan coba.
2. Pemberian diazinon pada tikus.
3. Terapi Madu Sumbawa pada masing masing perlakuan.
4. Pengambilan dan pembuatan preparat organ jejunum.
5. Pengukuran kadar MDA.
6. Pengukuran aktivitas protease.
7. Analisis data.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini meliputi:

Variabel bebas : induksi diazinon dan madu Sumbawa

Variabel tergantung : kadar MDA dan aktivitas protease

Variabel kontrol : tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar, umur, berat badan, dan pakan

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) sehat dengan berat badan 130-180 gram, yang sudah disertifikasi layak etik. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok dengan jumlah ulangan minimal 4 kali setiap kelompok perlakuan. Tikus diberikan pakan basal pada semua tikus selama 7 hari.

Kandang tikus dibuat menggunakan bak plastik dengan ukuran p.l.t =30x45x20 cm yang dilengkapi dengan botol minum tikus dan serbuk gergaji sebagai alas. Kandang ini akan diberi tutup kayu dan kawat strimin agar tikus tidak kabur. Kandang-kandang bak plastik ini akan diletakkan di dalam rak besi siku 6 susun dan dalam satu rak besi dapat menampung 18 kandang tikus.

4.6.2 Induksi Diazinon

Dosis diazinon 600 EC yang diberikan pada tikus sebanyak 60 mg/kgBB. Induksi dilakukan 1x setiap hari terbukti dapat menyebabkan kerusakan pada hepar (Aulia, 2017). Diazinon 1 mL diencerkan dalam akuades sebanyak 100 mL dengan konsentrasi 6 mg/mL. Diberikan secara peroral menggunakan sonde sebanyak 1 mL setiap hari pada tikus kelompok perlakuan 2, kelompok perlakuan 3, kelompok perlakuan 4, dan kelompok perlakuan 5. Pemberian diazinon dilakukan selama 7 hari dimulai pada hari ke-8 hingga ke-14.

4.6.3 Terapi Madu Sumbawa

- a. Terapi madu Sumbawa diberikan per oral pada selama 14 hari sebanyak 1 kali sehari 1 mL dengan konsentrasi 25% yang dilarutkan dalam akuades sebagai pengencer dan diberikan pada kelompok P1.
- b. Terapi madu Sumbawa diberikan per oral pada selama 14 hari sebanyak 1 kali sehari 1 mL dengan konsentrasi 50% yang dilarutkan dalam akuades sebagai pengencer dan diberikan pada kelompok P2

- c. Terapi madu Sumbawa diberikan per oral pada selama 14 hari sebanyak 1 kali sehari 1 mL dengan konsentrasi 75%. yang dilarutkan dalam akuades sebagai pengencer dan diberikan pada kelompok P3.

4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Jejunum

Pengambilan sampel organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke 29. Tikus dimatikan dengan cara *dislocatio os occipitale* dan diletakkan di atas papan bedah secara rebah *dorsal*. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen dilanjutkan dengan pengambilan organ Jejunum. Jejunum dipotong menggunakan gunting bedah dan dimasukkan dalam larutan PBS –azida Ph 7,4 dalam pot organ dan disimpan dalam *refrigerator*.

4.6.5 Isolasi Protease

Sebanyak 0,5 gram jejunum dipotong kecil dan ditambah PBS-tween : PMSF dengan perbandingan 9:1. Kemudian ditambahkan sedikit pasir kuarsa dan digerus menggunakan mortar dingin di atas balok es sampai homogen. Setelah itu, ditambahkan 2 mL -tween : PMSF. Selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung propilen steril dan divortex selama 10 menit agar homogen. Dilanjutkan dengan proses sonikasi menggunakan sonikator selama 10 menit dan dilanjutkan dengan proses sentrifugasi. Proses sentrifugasi dilakukan selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Diambil bagian supernatannya dan ditambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1. Kemudian larutan dibiarkan semalam hingga terbentuk endapan. Kemudian disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm dan diambil

endapannya. Endapan tersebut dikeringkan kemudian ditambahkan Tris HCl 0,02M pH 6,5 dengan perbandingan 1:1 (Aulanni'am, 2004).

4.6.6 Pengukuran Aktivitas Protease

Dicampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μ L, buffer fosfat Ph 7 sebanyak 300 μ L, dan enzim protease sebanyak 100 μ L. Kemudian didiamkan selama 60 menit pada suhu 37°C di atas penangas air. Selanjutnya dilakukan proses sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Ditambahkan TCA 4% (b/c) dan ditunggu selama 30 menit pada suhu 27°. Diambil supernatan sebanyak 100 μ L dan diencerkan 5 kali volume buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansi pada λ maks tirosin sebesar 275nm (Wati, 2013).

Perhitungan aktivitas protease menggunakan rumus Walter (1984):

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{tirosin}]}{Mr \text{ Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

P = Jumlah Enzim (mL)

fp = faktor pengenceran.

4.6.7 Pengukuran Kadar MDA

Sebanyak 0,5 gram organ jejunum bersama sedikit pasir kuarsa digerus hingga halus menggunakan mortar. Kemudian ditambahkan NaCl-fisiologis sebanyak 200 μ L. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung polipropilen dan ditambahkan akuades

sebanyak 550 μ L dan TCA sebanyak 100 μ L. Kemudian dihomogenkan. Ditambahkan 250 μ L HCl 1N kemudian dihomogenkan. Ditambahkan 100 μ L Na-Thio 1% dan disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 500 rpm. Setelah disentrifugasi, supernatan diambil dan disaring menggunakan *glass wool*. Selanjutnya supernatan dipanaskan dalam *waterbath* suhu 100°C selama 20 menit dan dilanjutkan proses pendinginan pada suhu ruang. Terakhir, supernatan dihitung nilai absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimal untuk uji TBA dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel (Aulanni'am, 2011).

4.6.8 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah nilai aktivitas protease dan kadar MDA (*malondialdehyde*) pada organ jejunum. Analisa data yang digunakan berupa data kuantitatif untuk mengetahui nilai aktivitas protease dan kadar MDA (*malondialdehyde*) pada organ jejunum menggunakan program *Microsoft Excel* dan SPSS versi 24.0 untuk uji *Analysis of varians* (ANOVA) serta dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha=5\%$, untuk mengetahui perbedaan setiap perlakuan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa Terhadap Aktivitas Protease pada Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Diazinon

Enzim protease merupakan enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Aktivitas protease merupakan kemampuan enzim protease untuk memecah protein. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran. Aktivitas protease diukur dengan menggunakan spektrofotometri dengan larutan kasein sebagai substrat didapat hasil sesuai pada (Lampiran 7). Hasil pengukuran aktivitas protease kemudian dilanjutkan dengan perhitungan menggunakan *One-Way ANOVA* sesuai dengan (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Rata-rata aktivitas protease jejunum tikus putih *Rattus norvegicus* yang diinduksi diazinon.

Perlakuan	Rata-rata Aktivitas Protease \pm SD (ng/mL)
Perlakuan 1	1,017 \pm 0,015 ^a
Perlakuan 2	1,522 \pm 0,017 ^e
Perlakuan 3	1,307 \pm 0,051 ^d
Perlakuan 4	1,185 \pm 0,038 ^c
Perlakuan 5	1,095 \pm 0,012 ^b

Keterangan : penggunaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) antar kelompok perlakuan.

Hasil analisa aktivitas protease diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan terhadap kelompok perlakuan 2 . Kelompok perlakuan 2 diberi induksi diazinon dengan dosis 60 mg/kgBB tanpa diberi terapi madu Sumbawa diperoleh hasil rata-rata sebesar 1,522 ng/mL, sehingga diketahui berbeda sangat nyata ($p<0,01$) dengan kelompok perlakuan 1.

Enzim protease yang terdapat pada kelompok perlakuan 1 disebabkan oleh protease secara normal berada di dalam sel yang berfungsi untuk sinyal transduksi dan regulasi sel. Protease memiliki peran dalam sinyal transduksi untuk aktivasi hormon polipeptida, faktor perkembangan, dan pertahanan tubuh. Faktor perkembangan yaitu pada perakitan kolagen dan prokolagen, serta berperan pada proliferasi sel yaitu kontrol proteolitik oleh siklin, degradasi serta berperan pada kematian sel yang terprogram (apoptosis) (Hardiany, 2013). Aktivitas protease dalam sel normal sampai saat ini belum didapatkan standar normalnya, sehingga nilai aktivitas protease pada kelompok perlakuan 1 digunakan sebagai standar untuk diketahui adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi akibat dilakukannya perlakuan.

Peningkatan yang terjadi pada kelompok perlakuan 2 disebabkan oleh adanya induksi diazinon. Diazinon yang masuk didalam tubuh akan diubah oleh enzim *Cytochrome P450* menjadi diazoxon yang bersifat radikal bebas. Diazoxon akan menyebabkan stres oksidatif dan menginduksi peroksidasi lipid (Himah, 2017). *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebih di dalam jaringan tidak ternetralisir oleh antioksidan dapat menyebabkan stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif akan menyebabkan kerusakan molekul seperti DNA, lipid, dan protein. Bila kondisi

tersebut berlangsung dalam waktu lama dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Hussain et.al., 2016).

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbit paling luar dan bersifat sangat reaktif. Radikal bebas ini akan merusak membran sel yang mengandung asam lemak jenuh (PUFA) menjadi peroksidasi lipid yang tidak stabil. Proses peroksidasi lipid terdiri dari beberapa tahapan reaksi yaitu inisiasi, propogasi, dan terminasi. Tahap inisiasi terjadi saat atom hidrogen pada gugus metilen oleh ROS membentuk radikal karbon (L^{\cdot}). Tahapan propagasi terjadi saat radikal karbon akan bereaksi dengan oksigen dimana akan terbentuk radikal peroksil (LOO^{\cdot}) dan berlanjut berikatan dengan atom hidrogen lipid lain membentuk hidrogen peroksida ($LOOH$) yang bersifat sitotoksik, sehingga terjadi reaksi berantai. Tahap terminasi akan terjadi saat radikal karbon yang terbentuk saat inisiasi ataupun radikal lain yang terbentuk pada tahap propagasi bereaksi dengan radikal lain membentuk produk non radikal (Setiawan dan Suhartono, 2007).

Kerusakan sel yang terjadi akibat adanya peroksidasi lipid yaitu disebabkan oleh perubahan kandungan cairan membran dan menyebabkan keluarnya enzim dari sel (Surya, 2013). Kerusakan sel akibat peroksidasi lipid dapat disebabkan juga oleh produk hasil peroksidasi lipid yaitu MDA. Selain itu radikal bebas dapat menyebabkan peningkatan infiltrasi sel-sel inflamasi yang dapat melepaskan enzim protease. Keadaan inflamasi menyebabkan infiltrasi sel-sel inflamasi seperti neutrofil, monosit, dan limfosit. Pada bagian inflamasi, sel-sel inflamasi aktif melepaskan banyak enzim (protease netral, elastase, kolagenase, asam hidrolase,

fosfatase, lipase) (Biswas, 2015). Sehingga, dapat diketahui bahwa adanya radikal bebas akibat induksi diazinon dapat meningkatkan aktivitas protease sel.

Kelompok perlakuan 3 yang diinduksi diazinon dan diterapi menggunakan madu sumbawa konsentrasi 25% berbeda sangat nyata ($p<0,01$) dengan kelompok perlakuan 2, didapat rata-rata 1,307 ng/mL. Kelompok perlakuan 4 yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa dengan konsentrasi 50% diperoleh rata-rata 1,185 ng/mL yang berbeda sangat nyata ($p<0,01$) dengan kelompok perlakuan 2. Pada kelompok perlakuan 5 yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa 75% didapat rata-rata sebesar 1,095 ng/mL yang berbeda sangat nyata ($p<0,01$) dengan kelompok perlakuan 2. Kelompok perlakuan 3, 4, dan 5 berbeda sangat nyata ($p<0,01$) dengan kelompok perlakuan 1 dan antar kelompok perlakuan.

Penurunan aktivitas pada kelompok perlakuan 3, 4, dan 5 dapat terjadi akibat adanya antioksidan yang terkandung dalam Madu sumbawa seperti polifenol dan vitamin C. Madu mengandung komponen antioksidan diantaranya vitamin C, polifenol, flavonoid, dan beberapa antioksidan lain (As'ari, 2009). Mekanisme kerja antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai donor elektron. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan pengubahan radikal lipid ke bentuk yang lebih stabil (Nofianti, dkk., 2015).

Flavonoid dan polifenol dapat menangkap radikal bebas sehingga dapat mencegah proses peroksidasi lipid di mikrosom dan liposom (Novianti, dkk., 2015).

Pemberian diazinon pada kelompok perlakuan 3, 4, dan 5 menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dari diazoxon yang bersifat radikal bebas. Diazoxon akan menyebabkan stress oksidatif dan menginduksi peroksidasi lipid (Himah, 2017). Hasil tahap propagasi adalah hidrogen peroksida (LOOH) yang bersifat sitotoksik dan akan menyebabkan reaksi berantai. Menurut Rohdiana (2001), penambahan antioksidan dapat memutus reaksi berantai pada proses peroksidasi lipid, seperti antioksidan sintesis, *Butylated hidroxy aniline* (BHA), *Butilated hidroxy toluen* (BHT), TBHQ ataupun antioksidan alami.

Flavonoid dan polifenol merupakan antioksidan alami yang terdapat pada tumbuhan. Flavonoid bekerja menangkap atau menetralkan radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) terkait dengan gugus OH fenolik, sehingga dapat memperbaiki keadaan jaringan yang rusak atau terhambatnya proses inflamasi (Asfari *et al.*, 2016). Terhambatnya proses inflamasi dapat menurunkan sel-sel inflamasi. Sehingga, aktivitas protease di dalam sel akan menurun. Flavonoid dapat menangkap radikal bebas dengan jalan reduksi senyawa radikal bebas sehingga menjadi senyawa yang stabil, sehingga menghambat kerusakan sel dan infiltrasi mediator inflamasi yang berakibat pada penurunan aktivitas protease (Pertiwi, 2012).

Polifenol sebagai antioksidan alami dapat menurunkan stres oksidatif dengan cara mencegah terjadinya reaksi berantai pengubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida dengan mendonorkan atom hidrogen dari kelompok aromatik hidroksi (-OH) polifenol membuangnya dari dalam tubuh melalui sistem ekskresi (Asfari, dkk., 2016). Penurunan stres oksidatif akan menyebabkan penurunan

kerusakan molekul seperti DNA, lipid, dan protein. Penghambatan reaksi berantai pengubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida menyebabkan penurunan peroksidasi lipid dimana peroksidasi lipid akan menyebabkan kerusakan sel secara langsung yaitu terjadinya kerusakan pada struktur membran sel sedangkan efek secara tidak langsung melalui produk-produk metabolit dari peroksidasi lipid. Kerusakan sel yang terjadi akibat adanya peroksidasi lipid yaitu disebabkan oleh perubahan kandungan cairan membran dan memobilisasi enzim sehingga dapat keluar melewati membran yang rusak tersebut (Surya, 2013). Terhambatnya respirasi mitokondria dan sintesa protein, akan mampu menarik neutrofil dan menginduksi respon inflamasi pada sel (Kusuma, 2010). Sehingga, secara tidak langsung polifenol dapat menurunkan aktivitas protease dengan cara menurunkan stres oksidatif dan menghambat reaksi berantai pengubahan superoksida menjadi hidrogen peroksida.

Vitamin C sebagai antioksidan sekunder bertugas menangkap radikal bebas dan menghambat reaksi berantai (Sayuti, 2015). Vitamin C (L-Askorbat) bekerja menangkap radikal bebas dengan cara menerima elektron tunggal dari superoksida, hidrogen peroksida, hipoklorit, dan radikal hidroksil dan peroksil (Marks, 2000). Seperti polifenol, vitamin C secara tidak langsung dapat menurunkan aktivitas protease dengan cara menurunkan stres oksidatif dan menghambat reaksi berantai berantai pengubahan superoksida menjadi hidrogen peroksida.

Berdasarkan hasil yang didapat diketahui bahwa madu Sumbawa dengan konsentrasi 75% 1 mL/ekor perhari merupakan konsentrasi terbaik dalam menurunkan kadar MDA pada jejunum tikus yang diinduksi diazinon sedangkan

pada konsentrasi 25%, 50%, dan 75% sebanyak 1 mL/ekor perhari memiliki pengaruh dalam menurunkan aktivitas protease, karena nilai yang diperoleh berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan kelompok perlakuan 2 dan kelompok perlakuan 1. Keadaan kelompok perlakuan 1 merupakan kelompok yang dianggap sehat karena tidak adanya nilai standar aktivitas protease pada jejunum, kelompok perlakuan 3, 4, dan 5 secara statistik memiliki aktivitas protease yang belum sama dengan kelompok tikus sehat. Hal ini disebabkan madu sumbawa memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah sehingga dengan dosis 75% belum mampu menurunkan aktivitas protease sampai keadaan normal.

Madu Sumbawa memiliki nilai IC_{50} sebesar 23293,9 ppm (Sumarlin, dkk., 2014). Dari hasil tersebut diketahui bahwa madu Sumbawa memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah (tidak aktif) karena memiliki nilai $IC_{50} > 500$ ppm (Azmi, dkk., 2015). Nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*) merupakan besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat menghambat radikal bebas sebanyak 50% (Ridho, 2013).

5.2 Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Kadar *Mallondialdehyde* (MDA) Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Diazinon

Diazinon merupakan pestisida golongan organofosfat yang banyak digunakan untuk mengatasi hama. Kinerja utama diazinon yaitu menghambat asetil kolin esterase (AChE) dalam sinaps syaraf sehingga penghantaran impuls syaraf terganggu (Costa, 2006). Diazinon tidak hanya membunuh hama, melainkan dapat mengancam makhluk hidup lain melalui kontaminasi di lingkungan terutama hasil tanaman sebagai sumber makanan serta air yang dapat mengancam hewan lainnya bahkan manusia. Gejala keracunan pada tikus yang timbul setelah paparan sub kronik diazinon menurut Ivanovic *et. al.* (2016) yaitu lakrimasi dan salivasi berlebih, kesulitan bernafas, perubahan perilaku tikus, bahkan diare. Hal ini sesuai dengan pengamatan selama penelitian dan didapatkan tikus mengalami diare yang ditandai perubahan warna serta tekstur feses tikus yang semakin lembek, perubahan perilaku suka menggigit jari dan kaki, serta munculnya sianosis pada hari ke-2 dan ke-3 induksi. Hasil ini sesuai dengan penelitian Hayes (2010) bahwa tikus yang mengalami intoksikasi diazinon secara akut menunjukkan adanya sianosis pada beberapa hari yang kemudian menghilang.

Diazinon yang diberikan akan diserap oleh jejunum dan akan terjadi metabolisme. Metabolisme yang terjadi pada jejunum merupakan metabolisme fase 1 yaitu proses oksidasi dan hidrolisis. Oksidasi akan mengaktivasi *thiono-organophosphat* dengan bantuan enzim *cytochrom P450*. *thiono-organophosphat* akan mengikat satu atom oksigen dan akan mengakibatkan ketidak stabilan, kemudian *thiono-organophosphat* akan terpecah menjadi *oxono-organophosphate* dan ion sulfur bebas, jika antioksidan di

dalam tubuh tidak mampu menangani radikal bebas yang terbentuk akibat terhambatnya AchE, radikal bebas yang terbentuk akan merusak sel-sel dan dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Teimori, 2006). *Malondialdehyde* (MDA) merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid akibat dari degradasi radikal bebas terhadap asam lemak tak jenuh (Yunus, 2001).

Pengukuran kadar *Malondialdehyde* (MDA) jejunum tikus putih pada setiap kelompok dilakukan dengan menggunakan metode uji *Thiobarbituric Acid* (TBA). Hasil didapat dari pengukuran nilai absorbansi pada panjang gelombang 532 nm (**Lampiran 6**). Hasil pengukuran kadar *Malondialdehyde* (MDA) selanjutnya dianalisis menggunakan *one way ANOVA* (**Tabel 5.2**).

Tabel 5.2 Rata-rata kadar *Malondialdehyde* (ng/mL) jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA \pm SD (ng/mL)
Perlakuan 1	142,75 \pm 5,20 ^a
Perlakuan 2	256,50 \pm 57,26 ^c
Perlakuan 3	207,12 \pm 4,26 ^{bc}
Perlakuan 4	172,75 \pm 7,77 ^{ab}
Perlakuan 5	144,62 \pm 5,54 ^a

Keterangan : penggunaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) antar kelompok perlakuan.

Hasil analisa kadar *Malondialdehyde* (MDA) diperoleh bahwa kadar MDA pada kelompok kontrol negatif K(-) memiliki rata-rata sebesar 142,75 ng/mL. Keberadaan MDA merupakan indikator dimana terjadinya kerusakan sel yang disebabkan oleh

peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid terjadi akibat adanya ikatan antara radikal bebas dengan asam lemak jenuh. Radikal bebas terjadi secara terus menerus di dalam tubuh. Hal ini terjadi melalui proses metabolisme sel normal, proses peradangan, kekurangan nutrisi, maupun respon adanya radiasi sinar gamma, ultraviolet, dan polusi lingkungan. Radikal bebas yang dihasilkan dari sisa proses metabolisme protein, karbohidrat, dan lemak pada mitokondria, proses peradangan, dan reaksi fagositosis (Sayuti, 2015). Dalam proses metabolisme sel normal, glukosa akan dioksidasi melalui reaksi yang melibatkan logam menjadi anion enediol, kemudian diubah menjadi ketoaldehid dan O_2^- . O_2^- mengalami dismutasi menjadi H_2O_2 yang tidak bisa didegradasi oleh katalase atau glutathione peroksidase sehingga menghasilkan OH^\bullet yang sangat reaktif. Anion superoksida dapat bereaksi dengan NO membentuk molekul reaktif peroxynitrit ($ONOO^-$) (Berawi, 2017). Sehingga, dapat diketahui bahwa MDA yang dihasilkan oleh kelompok kontrol negatif merupakan hasil dari metabolisme sel yang secara normal berjalan didalam tubuh.

Kelompok perlakuan 2 diberi perlakuan induksi diazinon dengan dosis 60 mg/kgBB tanpa diberi terapi madu Sumbawa. Sehingga diperoleh hasil rata-rata sebesar 256,50 ng/mL, dan diketahui berbeda secara signifikan ($p < 0,01$) dengan kelompok perlakuan 1.

Pemberian diazinon pada kelompok perlakuan 2 menyebabkan diazinon yang masuk didalam tubuh akan diubah menjadi diazoxon yang bersifat radikal bebas dalam tubuh. Diazoxon akan menyebabkan stres oksidatif dan menginduksi peroksidasi lipid (Himah, 2017). Salah satu produk akhir dari proses peroksidasi lipid adalah MDA.

Mekanisme pembentukan MDA melalui peroksidasi lipid diawali dengan penghilangan atom hidrogen (H) dari molekul lipid tak jenuh rantai panjang radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), sehingga lipid bersifat radikal. Radikal lipid ini bereaksi dengan atom oksigen (O_2) membentuk radikal peroksil ($\bullet\text{OO}$), yang selanjutnya menghasilkan MDA (Yustika, 2013).

Kelompok perlakuan 3 yang diinduksi diazinon dan diterapi menggunakan madu Sumbawa konsentrasi 25% tidak berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan kelompok perlakuan 2, didapat rata-rata 207,12 ng/mL. Kelompok perlakuan 4 yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa dengan konsentrasi 50% diperoleh rata-rata 172,75 ng/mL yang berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan kelompok perlakuan 2 namun tidak berbeda nyata ($p < 0,01$) dengan kelompok perlakuan 1. Kelompok perlakuan 5 yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa 75% didapat rata-rata sebesar 144,62 ng/mL yang berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan kelompok perlakuan 2

Penurunan kadar MDA pada kelompok perlakuan 3, 4, dan 5 dapat terjadi akibat adanya antioksidan yang terkandung dalam Madu sumbawa seperti polifenol, dan vitamin C. Madu mengandung komponen antioksidan diantaranya vitamin C, polifenol, flavonoid, dan beberapa antioksidan lain (As'ari, 2009). Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi dapat disebabkan oleh 4 macam reaksi yaitu: (1) pelepasan hidrogen dari antioksidan, (2) pelepasan elektron dari antioksidan, (3) penambahan lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan, (4) pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan

cincin aromatik dari antioksidan (Sayuti, 2015). Polifenol mampu menghambat proses peroksidasi lipid dengan cara mendonorkan satu atom hidrogen dari gugus hidroksil (OH) fenolik saat bereaksi dengan radikal bebas (Kamilatussaniah, dkk., 2015).

Polifenol yang terdapat dalam madu Sumbawa dapat menurunkan kadar MDA pada tikus yang diinduksi diaiznnon dengan cara menangkap radikal bebas. Polifenol sebagai antioksidan alami dapat menurunkan stres oksidatif dengan cara mencegah terjadinya reaksi berantai pengubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida dengan mendonorkan atom hidrogen dari kelompok aromatik hidroksi (-OH) polifenol membuangnya dari dalam tubuh melalui sistem ekskresi (Asfari, dkk., 2016). Vitamin C sebagai antioksidan sebagai antioksidan alami berfungsi mengikat O_2 , sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Vitamin C dan E sebagai antioksidan sekunder bertugas menangkap radikal bebas dan menghambat reaksi berantai (Sayuti, 2015). Vitamin C (L-Askorbat) bekerja menangkap radikal bebas dengan cara menerima elektron tunggal dari superoksida, hidrogen peroksida, hipoklorit, dan radikal hidroksil dan peroksil (Marks, 2000).

Penghambatan reaksi berantai pengubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida sehingga menyebabkan penurunan peroksidasi lipid. Produk hasil peroksidasi lipid yang secara biologis berperan penting yaitu Aldehida (MDA) (Kusuma, 2010). Sehingga dengan penurunan peroksidasi lipid dan penghambatan reaksi berantai peroksidasi lipid oleh flavonoid, polifenol, vitamin C yang terkandung dalam madu Sumbawa dapat menurunkan kadar MDA.

Berdasarkan hasil yang didapat diketahui bahwa kelompok perlakuan 3 dengan konsentrasi madu sumbawa 25% berbeda sangat nyata ($p<0,01$) dengan kelompok perlakuan 1 tetapi tidak berbeda nyata ($p<0,01$) dengan perlakuan 2, perlakuan 4 dan 5 memiliki pengaruh dalam menurunkan kadar MDA, karena nilai yang diperoleh berbeda sangat nyata ($p<0,01$) dengan kelompok perlakuan 2 dan tidak berbeda nyata ($p<0,01$) dengan kelompok perlakuan 1. Hasil pada perlakuan 3 dengan konsentrasi madu sumbawa 25% telah mampu menurunkan kadar MDA pada jejunum tikus namun belum mencapai pada keadaan normal, sedangkan pada perlakuan 4 dan 5 mampu menurunkan kadar MDA hingga mendekati keadaan normal. Sehingga dapat diketahui bahwa konsentrasi efektif untuk menurunkan kadar MDA pada jejunum tikus yang diinduksi diazinon adalah konsentrasi 75%. Hal tersebut dikarenakan madu sumbawa memiliki kekuatan antioksidan yang lemah, sesuai dengan Sumarlin (2014) bahwa madu Sumbawa memiliki nilai IC_{50} sebesar 23293,9 ppm, sehingga madu Sumbawa memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah (tidak aktif) karena memiliki nilai $IC_{50}>500$ ppm. Nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*) merupakan besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat menghambat radikal bebas sebanyak 50% (Ridho, 2013).

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat ditarik kesimpulan :

1. Pemberian terapi madu Sumbawa dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% merupakan konsentrasi yang mampu menurunkan aktivitas protease jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat induksi diazinon.
2. Pemberian terapi madu Sumbawa dengan konsentrasi 75% merupakan konsentrasi terbaik untuk menurunkan kadar *Mallondialdehyde* (MDA) jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat induksi diazinon.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut dosis toksik madu Sumbawa.
2. Perlu dilakukannya penelitian secara kualitatif.

DAFTAR PUSTAKA

- As'ari, H. 2009. *Efek Pemberian Madu terhadap Kerusakan Sel Hepar Mencit (Mus musculus) Akibat Paparan Parasetamol*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Asfari, R. Kusmiyati. Merta, W. J. 2016. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper crocatum) terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Mencit (Mus musculus)*. Jurnal Biologi Tropis, Januari 2016: Volume 16 (1) : 49-55
- Aulia, Zulfa. 2017. *Pengaruh Toksisitas Organofosfat (DIAZINON) Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Serta Aktivitas Malondialdehyde Dalam Serum Tikus (Rattus norvegicus)*. [Skripsi] Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya : Malang.
- Aulanni'am., A. Roosdiana., N. L. Rahmah. 2011. *Potency of Brown Seaweed (Sargassum duplicatum Bory) Ethanol and Ethyl Acetic Fraction to Malondialdehyde Concentration Decreasing and Histological Retrieval of IBD (Inflammatory Bowel Disease) Rat Small Intestinal Jejunum*. Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan Vol. 4, No. 1,
- Asrini, R. Aulanni'am. Wuragil D. K. 2012. *Aktivitas Enzim Protease Dan Gambaran Histopatologi Jejunum pada Tikus (Rattus Norvegicus) Fibrosis Jejunum Hasil Induksi Streptokinase*. Universitas Brawijaya: Malang.
- Azmi, A.N. Yunianta. 2015. *Ekstraksi Antosianin dari Buah Murbei (Morus alba. L) Metode Microwave Assisted Extraction (Kajian Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan : Pelarut)*. FTP. Universitas Brawijaya: Malang.
- Azrizal, M. T. *Perbandingan Pemberian Madu Hutan dan Madu Budidaya Pada Menit Ke-30 Terhadap Glukosa Darah Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung Angkatan 2015*. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Ayala, A., M. Muñoz, dan S. Argüelles. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2(2): 1-31.

- Berawi, K. N. Theodora, A. 2017. Efek Aktivitas Fisik pada Proses Pembentukan Radikal Bebas sebagai Faktor Risiko Aterosklerosis. Majority. Vol. 6 No. 2
- Biswas, S.K. 2015. Does the Interdependence between Oxidative Stres and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?. Hindawi Publishing Corporation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Vol. 2016. Article ID 5698931.
- Campbell, K.J. and N.D Perkins. 2006. Regulation of NF-kB Function. *Biochem Soc symp*, 73:165-180
- Costa, L. G. 2006. *Current Issues in Organophosphate Toxicology*. Clin. Chim. Acta 366 (2006) 1-13
- Cox, C. 2000. Diazinon: Toxicology. Journal of Pesticide Reform / Summer 2000 Vol. 20, No. 2.
- Debski, B., B. F. Kania, and T. Kuryl. 2007. Transformations of Diazinon, an Organophosphate Compound in The Environment and Poisoning by This Compound. Journal Ekologia (Bratislava) Vol. 26, No. 1 p. 68-82.
- Djumadi. Hariyatmi. Hanfi S. 2008. *Pengaruh Pemberian Insektisida Diazinon Dan Kurkumin Kunyit (Curcuma Domestica) Per-Oral Terhadap Perubahan Struktur Histologis Duodenum Mencit (Mus Musculus)*. Jurusan Pendidikan Biologi FKIP. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Elersek, T., and F. Metka. 2011. Organophosphorus Pesticides- Mechanisms of Their Toxicity. National Institute of Biology. Slovenia.
- Elling, B. K. M. Elling. A. A. 2015. *Anatomy & Physiology for the Prehospital Provider*. Jones & Barlett publisher.
- Haeria, H. A. T. Ugi. 2016. *Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bidara (Ziziphus spina-christi L.)*. Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences 2016 1(2):PP 57-61.
- Hardiany, N. S. 2013. Cathepsin dan Calpain : Enzim Pemecah Protein dalam Sel Cathepsin and Calpain : Proteolytic Enzyme in Cell. Departemen Biokimia & Biologi Molekuler. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Hayes, W.J., Jr., E.R. Laws, Jr., (eds.). *Handbook of Pesticide Toxicology. Volume 3. Classes of Pesticides*. New York, NY: Academic Press, Inc., 2010., p. 1052]

- Hreljac, I. 2009. Organophosphorus Pesticides Enhance The Genotoxicity of Benzo(a)pyrene by Modulating its Metabolism. *Mut Res* 671: 84-92
- Himah, S. 2017. Aktivitas Hepatoprotektor Tepung Kedelai (*Glycine max* L.) terhadap Peningkatan Kadar MDA Hati Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Diazinon. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Jember. Jember.
- Himawan, H. 2012. *Penetapan Kadar Residu Diazinon Pada Buah Stroberi (Fragaria Sp.) Setelah Pencucian Dengan Menggunakan Metode GC-MS*. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Hudri, F.A. 2014. *Uji Efektivitas Ekstrak Madu Multiflora dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Salmonella typhi*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Hussain, T. Ble, T. Yulong, Y. Francois, B. 2016. *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?*. Hindawi Publishing Corporation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Volume 2016, Article ID 7432797
- Ivanovic, Sasa R.; Dimitrijevic, Blagoje.; Cupic, Vitomir.; Jezdimirovic, Milanka. 2016. *Downregulation of Nicotinic and Muscarinic Receptor Function in Rats after Subchronic exposure to Diazinon*. [Jurnal] Departement of Pharmacology and Toxicology. Belgrade : Serbia.
- Kamilatussaniah. A, Yuniastuti. RS Iswari. 2015. *Pengaruh Suplementasi Madu Kelengkeng terhadap Kadar TSA dan MDA Tikus Putih yang Diinduksi Timbal*. *Jurnal MIPA* 38 (2) (2015) : 108-114.
- Kusuma, J. 2010. *Peranan Peroksidasi Lipid pada Patogenesis Preeklamsia*. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana. Denpasar.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Legowo, G. 2015. *Manfaat Madu sebagai Antioksidan dalam Melawan Radikal Dari Asap Rokok untuk Menjaga Kualitas Sperma*. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung. Lampung.
- Maula, I. F. 2014. *Uji Antifertilitas Ekstrak N-Heksana Biji Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) Pada Tikus Putih Jantan (Rattus norvegicus) Galur Sprague dawley Secara In Vivo*. [SKRIPSI]. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.

- Marks. 2000. Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah pendekatan Klinis. Suyono, Joko et al. Jakarta: EGC, ISBN: 979-448-483-0
- Ngabekti, S., dan W. Isnaeni. 2000. Pemanfaatan kurkumin untuk mengeliminir pengaruh diazinon terhadap kerusakan hati mencit (*Mus musculus* L.). Jurnal Manusia dan Lingkungan. 1(7): 24-34.
- Nofianti, T. Windiarti, D. Prasetyo, Y. 2015. *Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Krop Kubis Putih (Brassica oleracea L. var capitata) terhadap kadar Kolesterol Total dan Trigliserida Serum Darah Tikus Putih Jantan Galur Wistar*. Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada. Volume 14 Nomer 1
- Pertiwi, H.O.M. Aulanni'am. Herawati. 2012. *Aktivitas Protease dan Gamabran Histopatologi Epitel Bronkus Akibat Pengaruh Terapi Ekstrak DaunPutri Malu (Minosa pudica Linn.) terhadap Hewan Tikus (Rattus norvegicus) Model Asma*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Oksay, T., M. Naziroglu, O. Ergun, S. Dogan, O. Zatiks, A. Armagan, A. Ozorak, dan O. Elik. 2012. *N-acetyl cysteine attenuates diazinon exposure-induced oxidative stress in rat testis*. Article in *Andrologia*. 45(3): 145-216.
- Poet, T. S., A. A. Kousba, C. Timchalk. 2004. *Hepatic and Intestinal Metabolism of the Organophosphate Pesticides Chlorpyrifos and Diazinon*. Toxicological sciences 72. Chemical Dosimetry. Washington.
- Retno, T., S. Widyastuti, dan N. Suarsana. 2012. Pengaruh pemberian isoflavon terhadap peroksidasi lipid pada hati tikus normal. *Indonesia Medicus Veterinus*. 1(4) : 483 – 491.
- Ridho, E.A. 2013. *Uji Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (Cayratia trifolia) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Mohamed, R. I. 2009. *Effects of Exposure to Diazinon on the Lung and Small Intestine of Guinea Pig, Histological and Some Histochemical Changes*. Department of Zoology; Faculty of Science; Al-Azhar University; Cairo – Egypt
- Sayuti, Kesuma. Rina, Y. 2015. *Antioksidan, Alami dan Sintetik*. Andalas University Press. Padang.
- Setiawan, B., Suhartono, E. 2007. *Peroksidasi Lipid dan Terkait Stres Oksidatif pada Bayi Prematur*. Bagian Kimia Kedokteran. Fakultas Kedokteran. Universitas Lambung Mangkurat. Banjarmasin. Kalimantan Selatan

- Shah, M. D. Iqbal, M. 2010. *Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats*. Universiti Malaysia Sabah. Malaysia.
- Singh, Z. et all. 2014. *Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies : a Review*. Iranian J Publ Health, Vol. 43, pp 7-16.
- Sinha, P.K. Sharma, A. 2003. *Organophosphate poisoning : A review*. Department Medicine, Indira Gandhi Medical College Vol 12, No.2. Shimla. India.
- Sumarlin, L.O. A. Muawanah. P. Wardhani. Masitoh. 2014. *Aktivitas Antikanker dan Antioksidan Madu di Pasaran Lokal Indonesia*. Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia. Vol. 19 (3): 136-144.
- Surya, I.G.P. 2013. *Kadar Malondialdehyde (MDA) pada Abortus Inkomplit Lebih Tinggi Dibandingkan dengan Kehamilan Normal*. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana. Denpasar.
- Swenson, GM. 2000. Dules Physiology or Domestic Animals. *Journal Of Physiology and Pharmacology*, 38: 49-54
- Teimori, F. 2006. Alteration Of Hepatic Cell Glucose Metabolism as a Non-cholinergic detoxication Mekanisem in Counteracting Induced Oxidative Stress. In : Human & Experimental Toxicology. Vol.25.
- Ulansari, S. E. 2017. *Pengaruh Toksisitas Organofosfat (Diazinon) terhadap Gambaran Histologi Hepar serta Kadar MDA dalam serum Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Usman, M. R. 2013. *Kinetika fotokatalisis diazinon dengan titanium dioksida (tIO_2)*. [SKRIPSI]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Jember.
- Verdiansyah. 2016. *Pemeriksaan Fungsi Jejenum. Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik*. Rumahsakit Hasan Sadikin. Bandung.
- Wati, I. P. Aulanni'am. Mahdi, C. 2013. *Aktivitas Protease Dan Gambaran Histologi ginjal Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Pasca Induksi Cyclosporine-A*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius. Yogyakarta.
- Wulandari, T. 2006. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sambiloto (Andrographis paniculata Ness.) Terhadap Struktur Mikroanatomi Hepar Dan Kadar Glutamat Piruvat Transaminase Serum Mencit (Mus musculus L.) Yang*

Terpapar Diazinon. [SKRIPSI]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.

Xu, CPD. 2003. Gastrointestinal and Nutrition The Neonatal Pig. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 50:629-635

Yuningsih. 2010. *Penggunaan Asetonitril, $MgSO_4$ dan NaCl untuk Analisa Residu Pestisida DDE (Insektisida Organoklorin), Diazinon dan Fenthion (Insektisida Organofosfat) Dalam Pakan Ternak Dengan Cara Khromatografi Lapis Tipis*. Balai Besar Veteriner. Bogor.

Yuningsih dan Sri Yuliasuti. 1998. *Hasil Pemeriksaan peptisida Fenthion (Insektisida Organofosfat) Dalam Bahan Baku Pakan, pakan Domba Dan Isi Lambung Kambing*. Balai Besar Veteriner. Bogor.

Yunus, M. 2001. Pengaruh Antioksidan Vitamin C Terhadap MDA Eritrosit Tikus Wistar Akibat Latihan Anaerobik. *Jurnal Pendidikan Jasmani* 1: 9-16.

Yustika, A. R. Aulanni'am. Prasetya S. 2013. *Kadar Malondialdehid (Mda) Dan Gambaran Histopatologi Pada Jejenum Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Pasca Induksi Cyclosporine-A*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.

Zulhawa, D. J. 2010. *Daya Hambat Madu Sumbawa terhadap Pertumbuhan Kuman Staphylococcus aureus Isolat Infeksi Luka Operasi Rs Islam Amal Sehat Sragen*. [SKRIPSI]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.